ALINE CADORINI SILVEIRA

O efeito do suplemento do ácido ursólico em camundongos mdx

São Paulo

2017

ALINE CADORINI SILVEIRA

O efeito do suplemento do ácido ursólico em camundongos mdx

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Doméstico e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr^a Maria Angélica Miglino

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3590
FMVZ

Silveira, Aline Cadorini
O efeito do suplemento do ácido ursólico em camundongos mdx / Aline Cadorini
Silveira. – 2017.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Casca da maçã. 2. Distrofia muscular. 3. Inflamação. 4. Suplementação natural. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O EFEITO DO SUPLEMENTO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS MDX", protocolada sob o CEUA nº 6862041016, sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino e equipe; Aline Cadorini Silveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 23/11/2016.

We certify that the proposal "THE EFFECT OF ACID URSOLIC SUPPLEMENTATION IN MDX MICE ", utilizing 30 Isogenics mice (30 males), protocol number CEUA 6862041016, under the responsibility of **Maria Angélica Miglino and team; Aline Cadorini Silveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/23/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 12/2017

Área: Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres

Origem: Animais provenientes de doação espontânea

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 30 a 30 dias

N: 30

Linhagem: Mus musculus linhagem C57/BLmdx

Peso: 15 a 25 g

Resumo: A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular, de origem genética ligada ao cromossomo X, causada pela mutação do gene que codifica a proteína distrofina, responsável pela estabilidade do sarcolema. Na ausência/deficiência da distrofina, as células musculares ficam suscetíveis a danos induzidos pelos ciclos contínuos de degeneração e regeneração limitada. Inflamação, necrose e fibrose são as características fisiopatológicas que acarretam a principal consequência da DMD, a perda da função muscular. O camundongo mdx é um modelo distrófico, amplamente utilizado em pesquisas devido sua uniformidade genética, facilidade de manuseio e reprodução. Infelizmente, até hoje, não há cura para DMD. Entretanto, os avanços da terapia farmacológica através do uso dos glucocorticóides, beneficiou o curso natural da doença. Contudo, o uso dos glucocorticóides, trouxeram alguns efeitos colaterais. Em razão disso, muitos estudos tem sido realizados em torno de como minimizar os efeitos colaterais. Dentre esses estudos, destaca-se o uso de suplementos biologicamente baseados. Neste trabalho propusermos analisar o uso do ácido ursólico (AU). O AU é um componente natural, presente na casca da maçã, que apresenta capacidade de atuar como inibidor da atrofia muscular, aumentando a massa e a força muscular. Visando diminuir os efeitos colaterais do uso dos glucocorticóides, neste trabalho objetivará analisar os efeitos do AU no combate da atrofia muscular e aumento da resistência muscular no modelo mdx. Será avaliado os efeitos do AU na suplementação alimentar do camundongo mdx durante 4 semanas. Duas dosagens de AU serão avaliadas: 10 e 200 mg/Kg. Após 4 semanas, todos os animais serão eutanasiados e será coletado amostras de sangue para análise da proteína creatino-quinase (CK). Serão analisadas as citocinas fibrogênicas e a histopatologia dos músculos extensor longo dos dedos (ELD), tibial anterior (TA) e diafragma (DIA). O Teste de Konziela será realizado para mensurar possível alteração na força muscular dos animais do presente estudo. Espera-se que os resultados obtidos nesta pesquisa, gerem dados baseados em evidências consistentes para a validação do uso do AU no tratamento da DMD.

Local do experimento: Faculdade de Medicina do ABC - FMVZ-USP

São Paulo, 24 de novembro de 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVEIRA, Aline Cadorini

Título: **O efeito do suplemento do ácido ursólico em camundongos mdx**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos animais domésticos e silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Pai, Mãe e Fran

Obrigada por todo suporte que me deram nesta minha caminhada,

Sempre respeitando todas as minhas escolhas.

Não sei se conseguiria sem vocês.

Vocês são meu ponto de apoio, meu paraíso aqui na terra.

É uma honra e um privilégio poder conviver

E ter a alegria de ter vocês como exemplo nessa vida.

É um amor incondicional...

E se sou o que sou hoje é reflexo de vocês.

Obrigada por existirem na minha vida.

Luis Augusto (Gigio)

Obrigada por sempre me apoiar, pela paciência...

Te amo muito e eternamente agradecida pelo tempo que você dedica a mim,

Não tem nada mais valioso...

Te amo...

AGRADEÇO...

A minha querida orientadora, Prof. Maria Angélica por ter me dado esta valiosa oportunidade. Pelos ensinamentos, disponibilidade e pela confiança. Por escutar as minhas ideias e direcioná-las da melhor maneira possível. Serei grata para sempre, por todos os momentos, que foram de extrema riqueza para o meu amadurecimento tanto pessoal quanto profissional.

A toda minha família em especial a Tia Dora que sempre me incentivou e acreditou em mim. Fernanda pelo apoio, pelo teto, pelas palavras, desabafos, incentivos, pela nossa convivência nesses anos... A Ana Carolina que me inseriu na estatística, e que deixou os meus dias mais alegres no laboratório. Que família abençoada que eu possuo...

Aos colegas, professores, funcionários da FMVZ-USP, pelo carinho, respeito e pela troca de conhecimento.

Aos queridos amigos Rodrigo Barreto e Thaís Borges Lessa, não existem palavras que mensurem a gratidão que eu tenho por ter conhecido vocês. Imensamente grata pelo tempo, paciência, amizade e muito aprendizado.... Vocês foram e são muito importantes na minha vida.

Ao professor Dr. David Feder, por conceder a oportunidade de trabalhar em outra universidade, pela doação dos animais usados nesta pesquisa, pela instrução, paciência, pelas ideias e questionamentos. Espero poder ter novas oportunidades e parceria com o senhor.

A todos da faculdade de Medicina do ABC, Dra. Giuliana, José, todos do laboratório da Dra Alzira, funcionários, por me receberem de braços abertos. Dr. Fernando, que disponibilizou o seu laboratório de análises, Bia, Teka, Gláucia e ao querido Matheus, onde com toda paciência, me ensinou sobre a técnica de PCR, e me auxiliou em tudo, meus sinceros agradecimentos, do fundo do coração.

A Capes, Proex, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

*“A imaginação é mais importante que o conhecimento.
O conhecimento é limitado.
A imaginação envolve o mundo.”*

Albert Einstein

RESUMO

SILVEIRA, A.C. **O efeito do suplemento do ácido ursólico em camundongos mdx. [Ursolic acid supplementation effect in mdx mice]**. 2017. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular, de origem genética ligada ao cromossomo X, locus Xp21, causada por uma mutação do gene que codifica a proteína distrofina, responsável pela estabilidade do sarcolema. Na ausência / deficiência de distrofina, as células musculares são susceptíveis a danos pelos ciclos contínuos de degeneração e regeneração limitada. Inflamação, necrose e fibrose são características fisiopatológicas que levam à principal consequência da DMD, a perda de função muscular. Ocorre uma vez em cada 3000 - 3500 nascidos do sexo masculino. O camundongo mdx é um modelo distrófico amplamente utilizado na pesquisa devido à sua uniformidade genética, fácil manuseio e reprodução. Ainda não há cura da DMD, no entanto, os avanços na terapia de drogas usando glicocorticoides diminuem a progressão da doença. Posteriormente, foram estudadas terapias alternativas, dentre elas a terapia com ácido ursólico (AU). O AU é um composto natural da família triterpenóide que atua como um inibidor da atrofia muscular, aumentando a massa muscular e a força muscular. Com o objetivo de usar a AU como uma terapia alternativa, foi analisado seu efeito na suplementação diária em 20 mdx avaliados por 4 semanas. Após o tratamento foram realizadas medidas sérica de creatinofosfoquinase (CPK), teste de Kondziela para medir a força muscular, análise das citocinas fibrogênicas TNF- α e TGF- β e a histopatologia dos músculos extensor longo dos dedos (ELD), tibial cranial (TA) e diafragma (DIA). Como resultado, o grupo tratado com AU mostrou diminuição dos níveis de CPK e aumento significativo da força muscular, diminuição da expressão das citocinas TNF- α e TGF- β , maior regeneração muscular, estabilidade das fibras, indicando que o AU oferece uma proteção para as fibras musculares.

Palavras-chaves: casca da maçã, distrofia muscular, inflamação, suplementação natural.

ABSTRACT

SILVEIRA, A.C. **Ursolic acid supplementation effect in mdx mice. [O efeito do suplemento do ácido ursólico em camundongos mdx]**. 2017. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe genetic neuromuscular disease, linked to the X chromosome, Xp21 locus, caused by a mutation of the gene that encodes the protein dystrophin, is responsible for the stabilization of sarcolemma. In the absence / dystrophin deficiency, muscle cells are susceptible to damage by the continuous cycles of degeneration and limited regeneration. Inflammation, necrosis and fibrosis are pathophysiological characteristics that lead to the main consequence of DMD, the loss of muscle function. It occurs once in every 3000 - 3500 live male births. The mdx mouse is a dystrophic model widely used in research due to its genetic uniformity, easy handling and reproduction. However, there is no DMD cure, however, advances in drug therapy using glucocorticoids decrease the progression of the disease. Subsequently, alternative therapies were studied, i.e. therapy with ursolic acid (UA). UA is a natural compound of the triterpenoid family that acts as an inhibitor of muscle atrophy, increasing muscle mass and strength. With the objective of using UA as an alternative therapy, the effect of daily supplementation at 20 mdx was evaluated for 4 weeks. After treatment were conducted measurements of serum creatine phosphokinase (CPK), Kondziela test to measure muscle strength, fibrogenic cytokine and histopathological analysis of the long extensor muscle (ELD), cranial tibialis (TA) and the diaphragm (DIA) muscles. As a result, the UA treated group showed decreased CPK levels, and increased muscle strength, decreased expression of TNF- α , TGF- β cytokines, greater muscle regeneration, fiber stability, indicating protection of muscle fibers to injury.

Keywords: Apple wax, muscular dystrophy, inflammation, natural supplementation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo do levantar miopático ou Sinal de Gowers	18
Figura 2 - Teste de Kondziela e cuidados para sua aplicação	26
Figura 3 - Camundongo mdx após eutanásia com exposição dos músculos a serem coletados TA e ELD	27
Figura 4 - Estrutura correspondente a um músculo normal	30
Figura 5 - Fotomicrografia do músculo Diafragma (DIA), de camundongo mdx, técnica HE, analisando os três grupos estudados	32
Figura 6 - Fotomicrografia do músculo Extensor Longo dos Dedos (ELD), de camundongo mdx, técnica HE, analisando os três grupos estudados	32
Figura 7 - Fotomicrografia do músculo Tibial Cranial (TA), de camundongo mdx, técnica HE, analisando os três grupos estudados	33
Figura 8 - Fotomicrografia do músculo TA, após tratamento com ácido ursólico (AU), apresentando o surgimento de novas miofibras	34
Figura 9 - Fotomicrografia do músculo DIA, técnica de Tricromo de Masson (TM), analisando a fibrose	35
Figura 10 - Fotomicrografia do músculo ELD, técnica de TM, analisando a fibrose ..	35
Figura 11 - Fotomicrografia do músculo TA, técnica de TM, analisando a fibrose	36
Figura 12 - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do músculo DIA, analisando grupo solução fisiológica e AU	37
Figura 13 - Imagem de MEV do músculo DIA, analisando grupo óleo de milho e AU	38
Figura 14 - Imagem de MEV, analisando o músculo ELD	39
Figura 15- Imagem de MEV, analisando o músculo TA	40
Figura 16 - Início protocolo para extração do RNA - RT-qPCR	44
Figura 17 - Processo de maceração do músculo - RT-qPCR	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação dos níveis de creatinofosfoquinase (CPK) nos camundongos mdx, análise dos grupos controle e tratado	29
Gráfico 2 - Quantidade de núcleos centrais presentes nos músculos DIA, TA e ELD, nos grupos controle e tratado	34
Gráfico 3 - Avaliação do peso dos animais antes e ao final do tratamento	41
Gráfico 4 - Análise da força dos camundongos mdx	41
Gráfico 5 - Apresentação dos dados em colunas, correlacionando PESO X FORÇA	42
Gráfico 6 - Análise da expressão das citocinas fibrogênicas TNF- α e TGF- β	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AU	Ácido Ursólico
C	grupo controle solução fisiológica
C óleo	grupo controle óleo
CDG	Complexo distrofina-glicoproteína
CPK	Creatinofosfoquinase
DIA	Músculo Diafragma
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELD	Músculo extensor longo dos dedos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMABC	Faculdade de Medicina do ABC
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase
HE	Hematoxilina e Eosina
IGF-1	Fator de crescimento Insulina-1
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
mdx	Distrofia muscular ligada ao cromossomo X (<i>X chromosome-linked muscular dystrophy</i>)
MEV	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MURF-1	muscle RING-finger protein-1 ou atrogina
NC	Fibras com núcleo central
RT-qPCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase em tempo real
TA	Músculo Tibial Cranial
TGF- β	Fator transformador de crescimento Beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TM	Tricromo de Masson

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	19
2.2	INFLAMAÇÃO, REGENERAÇÃO E FIBROSE	21
2.3	CAMUNDONGO mdx	23
2.4	ÁCIDO URSÓLICO	24
3	HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA	25
4	OBJETIVOS	25
4.1	OBJETIVO GERAL	25
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	26
5	MATERIAL E MÉTODO	26
5.1	MATERIAIS	27
5.2	MÉTODOS	28
5.2.1	Metodologia utilizada para aplicar o Teste de Kondziela	28
5.2.2	Metodologia utilizada para avaliação dos níveis séricos de Creatinofosfoquinase (CPK)	29
5.2.3	Metodologia para coleta dos músculos	29
5.2.4	Metodologia para a Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e contagem dos núcleos centrais	30
5.2.5	Metodologia para análise do Tricromo de Massom	30
5.2.6	Metodologia para análise das citocinas fibrogênicas	30
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
6	RESULTADOS	31
6.1	ANÁLISE DA CPK	31
6.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA	32
6.2.1	Análise Macroscópica	32
6.2.2	Análise Histológica	33
6.2.2.1	Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)	33
6.2.2.2	Análise de fibras com núcleos centrais	35
6.2.2.3	Tricromo de Massom	36
6.2.2.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38

6.3	KONDZIELA TEST (Teste de Força)	43
6.4	ANÁLISE DAS CITOCINAS FIBROGÊNICAS TNF- α E TGF- β	45
7	DISCUSSÃO	48
8	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária ligada ao cromossomo X, caracterizada pela fraqueza muscular progressiva nos primeiros anos de vida com posterior morte prematura na terceira década de vida devido à insuficiência cardíaca e ou respiratória. A DMD incide em 1 em cada 3500 meninos nascidos vivos e ocorre devido a uma mutação no gene que codifica a distrofina (McGREEVY et al., 2015; LESSA et al., 2012; SIENKIEWICZ et al, 2015).

Mutações na distrofina podem abolir sua função, seja por disrupções no quadro de leitura ("frame-shift") ou pela geração de um códon de parada prematura. A análise histopatológica confirma a ausência desta proteína e a conexão entre a actina do citoesqueleto e o tecido conjuntivo é perdida, e as fibras musculares ficam facilmente danificadas durante a contração muscular, levando a um dano muscular crônico, inflamação e eventualmente, substituição das fibras musculares por tecido adiposo e fibrótico. Por conseguinte, observa-se perda da função muscular (AARTSMA-RUS et al., 2016).

A DMD é caracterizada pela degeneração progressiva das fibras musculares esqueléticas e substituição por tecido conjuntivo e adiposo que leva à fraqueza muscular prejudicando a capacidade de deambulação, respiração, alimentação e função cardíaca, a qual leva ao óbito e ainda não há cura (SIENKIEWICZ et al, 2015).

Existem alguns modelos animais experimentais utilizados para a DMD, os quais possibilitam o entendimento de vários mecanismos que acontecem nesta doença, dentre eles há o camundongo mdx (*X chromosome-linked muscular dystrophy mouse, mdx*) o qual apresenta uma mutação espontânea da DMD, no ponto do éxon 23 do gene, que forma um códon com parada prematura (SICINSKI et al., 1989). É um modelo amplamente utilizado em diversos estudos, devido a sua uniformidade genética, facilidade de manuseio e reprodução. (BULFIELD et al., 1984; WILLMANN et al., 2012). Entretanto, seu fenótipo é considerado suave, pois sua performance funcional e expectativa de vida é próxima do normal (SICINSKI et al., 1989; DECONINCK et al., 1997; VAN PUTTEN, 2011).

Nas primeiras duas semanas de vida do mdx, os músculos esqueléticos não apresentam diferenças quando comparados a camundongos normais. Somente entre a 3 - 6 semanas, observa-se necroses. Picos de fraqueza e necrose nos músculos

dos membros são observados por volta de 8 -16 semanas. Após este período, estas alterações retrocedem espontaneamente, pelo aumento da capacidade regenerativa, com exceção do músculo diafragma onde o processo de degeneração permanece progressivo (ZHOU et al., 2008; McGREEVY et al., 2015).

O ácido ursólico (AU) é um componente lipofílico, derivado de componentes naturais presente em muitas espécies de plantas, frutas, principalmente na casca da maçã, vem demonstrando um grande potencial biológico e baixa toxicidade (OGASAWARA et al., 2013; LIU, 2005). Recentes estudos sugerem que o AU atua como uma pequena molécula que inibe a atrofia dos músculos esqueléticos e aumenta a massa e a força muscular em modelos animais de laboratório, possuindo efeitos anti-inflamatório (BAKHTIARI et al., 2016, LEE et al., 2017).

Tendo em vista os progressivos danos musculares observados na DMD e o potencial do AU no combate da atrofia, do processo inflamatório, no aumento da massa e da força muscular, neste estudo, avaliou-se os efeitos do AU na suplementação alimentar diária do camundongo mdx durante o período de 4 semanas, procedendo a avaliação morfológica, histopatológica, análise das citocinas fibrogênicas e mensuração da força, comparando os grupos que foram tratados com AU e os não tratados (controle - solução fisiológica e óleo de milho).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum e severa forma dentre as distrofias musculares. É de origem genética, de caráter recessivo ligado ao cromossomo X, o qual possui uma mutação no locus Xp21 que codifica a distrofina, uma proteína sarcolêmica (a membrana que envolve a fibra muscular é chamada de sarcolema), onde sua ausência/deficiência gera um processo de degeneração muscular progressiva e com consequente perda da função (PETKOVA et al., 2016); SIENKIEWICZ et al, 2015; NAKAMURA; TAKEDA, 2011).

A distrofina, cujo peso molecular é de 427 kDa, é uma proteína necessária para a integridade da membrana celular, sendo expressa principalmente no músculo esquelético e cardíaco. Esta interage com o filamento de actina e com várias outras proteínas e glicoproteínas formando o complexo distrofina-glicoproteína (CDG), fornecendo uma ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular, garantindo assim a distribuição uniforme do estresse durante a contração muscular, protegendo a membrana plasmática das células musculares (ENGEMBE et al., 2016; MURPHY; OHLENDIECK, 2016; CHANG; CHEVALIER; RUDNICKI, 2016).

Mutações na distrofina podem abolir sua função, seja por disrupções no quadro de leitura (“frame-shift”) ou pela geração de um códon de parada prematura, o qual gera uma proteína truncada, não funcional nos pacientes com DMD. Como resultado, a conexão entre a actina do citoesqueleto e o tecido conjuntivo é perdida e as fibras musculares ficam facilmente danificadas durante a contração muscular, ocasionando um influxo de cálcio na célula, ativando a cascata inflamatória, com consequente dano muscular crônico, inflamação, determinando a ruptura e necrose das fibras musculares esqueléticas, cardíacas e do músculo liso. Observando-se como consequência a perda da função muscular (AARTSMA-RUS et al., 2016; KATASHIMA, 2017).

O diagnóstico da DMD inicialmente se baseia no quadro clínico do paciente, na história familiar, seguido da dosagem de creatinofosfoquinase (CPK) no sangue, a qual apresenta-se aumentada significativamente. Esta enzima encontra-se em

grandes concentrações no músculo esquelético e no miocárdio, presente também na circulação sanguínea após a injúria destes tecidos em níveis proporcionais a lesão. Considerada uma medida fidedigna para avaliação da lesão muscular na DMD e no modelo mdx, onde o aumento dos níveis séricos de CPK no sangue são representativos de lesão muscular (CARLSON, 2014; DESGUERRE; LAUGEL, 2015).

A biópsia muscular é realizada para estudo qualitativo e quantitativo da proteína distrofina no músculo desse paciente. Nos casos em que não for encontrado uma mutação, faz-se o sequenciamento genético. (DIAMENT; CYPEL, 1996; DESGUERRE; LAUGEL, 2015; BOCA, 2016). Utiliza-se o exame de DNA (ácido desoxirribonucleico) pelo MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), é uma técnica rápida e altamente sensível usada para detectar deleções e duplicações no gene DMD (DEEPHA et al, 2017).

A sintomatologia da DMD, em humanos, normalmente pode ser observada aos dois anos de idade. Porém, muitas vezes somente se torna perceptível aos pais ao redor dos 5 anos de idade, quando a criança começa a ter dificuldades de subir ou descer escadas e apresentar quedas frequentes. Isto acontece devido a fraqueza muscular, inicialmente da cintura pélvica e posteriormente na cintura escapular. A criança apresenta o “Sinal de Gowers” ou levantar miopático, o qual devido a esta fraqueza muscular ela realiza uma escalada sobre si (CAROMANO, 1999; MCKANE, 2017).

Figura 1 - Figura esquemática representando o levantar miopático ou Sinal de Gowers.

Fonte: (lifineucb.blogspot.com, 2016).

A fraqueza muscular inicial leva a criança a ter imperfeições na marcha, no correr, brincar, sentar e levantar e progressivamente por volta dos 12 anos de idade leva ao uso da cadeira de rodas e as disfunções dos músculos axiais resultam em alterações das curvaturas fisiológicas da coluna vertebral, como exemplo o desenvolvimento da escoliose (ARAÚJO et al., 2004; MCKANE et al., 2017).

Na fase não ambulatorial, a progressão da fraqueza muscular leva a um declínio da função do braço e da mão, necessitando de recursos terapêuticos. A fibrose e necrose do miocárdio resulta-se em cardiomiopatias, a expectativa de vida é severamente reduzida, e a morte súbita ainda pode ocorrer antes dos 20 anos de idade. Em torno da 2ª a 3ª década de vida, estes pacientes necessitam de recursos ventilatórios não invasivos, sendo o comprometimento cardíaco e ou respiratório responsáveis por 80% da causa mortis, devido à insuficiência respiratória sobreposta a um quadro infeccioso e/ou insuficiência cardíaca (CAROMANO, 1999; KORNEGAY et al., 1999; FLANIGAN, 2014; MCKANE et al., 2017).

No entanto, o tratamento nos dias de hoje tem evoluído, permitindo uma sobrevivência além da terceira década de vida para a maioria dessas crianças atualmente diagnosticadas. Tratamento utilizando a fisioterapia motora e respiratória e o uso dos glicocorticoides, sendo normalmente iniciados em torno dos 5 anos de idade. Quanto mais precoce o tratamento, maior qualidade de vida este paciente irá ter. Os glicocorticoides prolongam a fase ambulatorial desses pacientes, promovendo uma melhor qualidade de vida, onde a perda da deambulação é estimada ser adiada por 3 anos, porém com efeitos colaterais. Tanto a prednisona quanto o deflazacort (este aprovado pela FDA - *Food and Drug Administration*, em março deste ano), são utilizados em vários níveis e a dosagem pode ser diária ou intermitente com intervalos variáveis. Até o momento não há nenhum tratamento que impeça este quadro, entretanto métodos alternativos para diminuir ou tardar a progressão clínica vem sendo investigados (NIKIS, 2017).

2.2 INFLAMAÇÃO, REGENERAÇÃO E FIBROSE MUSCULAR

A resposta inflamatória após o dano celular é um evento de extrema importância, estando relacionada diretamente com a patogênese da doença, onde a

ausência/deficiência da distrofina acarreta a lesão das fibras musculares. Há uma instabilidade da membrana, ocorrendo um influxo exacerbado de cálcio o qual altera a fibra muscular, gerando intensa inflamação (infiltrados inflamatórios) e necrose (CHEN et al, 2005; VANDENABEELE, 2010).

Estudo descrevem a inflamação crônica associada a perda da função muscular, onde pacientes com DMD estando na progressão da doença apresentaram altos índices de CPK e TNF- α . Outro fator contribuinte para a inflamação sistêmica na DMD é a obesidade, podendo estar ou não associada ao tratamento com glicocorticoides. Em uma amostra de um estudo 22.7% dos pacientes não faziam uso do glicocorticoide, porém apresentavam sobrepeso / obesidade quando avaliados pelo índice de massa corporal (IMC). O grupo que estava fazendo uso do glicocorticoide, foi notada uma prevalência de 68% dos pacientes tinham sobrepeso / obesidade. A obesidade provoca a inflamação, pois o tecido adiposo secreta as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6. Já é sabido que os glicocorticoides reduzem a inflamação, mas vários estudos demonstram seus efeitos adversos secundários e que são graves, tais como catarata, glaucoma, diabetes *mellitus*, hipertensão, infarto, osteoporose, quadros psiquiátricos, entre outros. Portanto, intervenções terapêuticas são necessárias para diminuir o processo inflamatório desencadeado por dano das fibras musculares e obesidade em pacientes com DMD (CRUZ et al, 2017).

No processo de degeneração as fibras musculares liberam várias substâncias, destacando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), que contribuem em altas concentrações ou exposições crônicas para o aumento da necrose e inflamação em músculos distróficos, possuindo um papel importante na regulação da inflamação crônica e o TGF- β (*transforming growth factor beta*) envolvido na inflamação, na formação de fibrose, crescimento celular e reparação tecidual (BUDASZ-SWIDERSKA et al., 2005; BURKS; COHN, 2011; KLINGLER et al., 2012).

A fibrose muscular é uma característica morfológica também encontrada nos indivíduos afetados pela DMD, é um tecido cicatricial fibroso, resultado do processo de reparo muscular. O processo de regeneração muscular é muito complexo e depende de vários fatores tais como extensão e duração da lesão. As miofibras com ausência/deficiência de distrofina apresentam inflamação e degeneração muscular crônica, onde os ciclos de degeneração e regeneração leva ao esgotamento das células satélites, e quando estas estão esgotadas as fibras musculares danificadas

são substituídas por tecidos fibrosos e adiposos, comprometendo toda a função muscular (CARVALHO, 2017).

A diminuição da fibrose e do processo inflamatório é de grande interesse no tratamento da DMD, visto que estes podem retardar a degeneração muscular (SERRANO & MUÑOZ-CÁNOVES, 2010).

A capacidade regenerativa muscular é limitada e compreende a proliferação de células satélites e na sua diferenciação em mioblastos. Estas células são capazes de se diferenciar e se fundir aumentando o número de fibras musculares existentes e formando novas fibras. Alguns estudos mostram que em estágios mais avançados da DMD há um aumento nas células satélites, porém não compensa a perda de tecido muscular após os ciclos de necrose e regeneração da musculatura distrófica, prevalecendo assim um tecido cicatricial fibro-adiposo, com perda da sua função contrátil (CICILIOT et al, 2013).

2.3 CAMUNDONGO MDX

O camundongo mdx (*X chromosome-linked muscular dystrophy, mdx*) é um modelo amplamente utilizado em pesquisas científicas que envolve a DMD, devido a sua uniformidade genética (linhagem isogênica), facilidade de manuseio e reprodução. O camundongo mdx foi inicialmente identificado na colônia do camundongo C57BL10/ScSn, apresentando níveis elevados das enzimas musculares piruvato quinase e creatinofosfoquinase (BULFIELD et al., 1984; DUCLOS ET AL. 1998; WILLMANN et al., 2012).

No mdx a ausência de expressão da proteína distrofina ocorre devido a uma mutação no éxon 23 do gene, que forma um códon com parada prematura (SICINSKI et al., 1989). Entretanto, seu fenótipo é considerado suave, pois a perda de força muscular é mais acentuada no músculo diafragma, levando a diminuição da expectativa de vida em 25%; enquanto que em humanos há perda generalizada da força muscular e diminuição da expectativa de vida em 75% (SICINSKI et al., 1989; DECONINCK et al., 1997; VAN PUTTEN, 2012; CHAMBERLAIN et al., 2007; McGREEVY et al., 2015).

Nas primeiras duas semanas de vida, os músculos do camundongo mdx não apresentam alteração, porém a partir da terceira semana de vida, após o desmame, o mdx apresenta fraqueza muscular e atinge picos de fraqueza e necrose nos músculos dos membros por volta de 8-16 semanas. Após este período, grande parte dos músculos esqueléticos no camundongo mdx entram numa fase relativamente estável e iniciam uma considerável regeneração muscular, por isso também seu fenótipo é descrito como suave. Entretanto, o músculo diafragma apresenta deterioração progressiva (ZHOU et al., 2008; McGREEVY et al., 2015).

Devido a essas alterações, a presença de degeneração das fibras musculares, resulta num aumento do número de novas miofibrilas, com núcleos centralizados, apresentando assim características histológicas e bioquímicas séricas muito semelhante a DMD humana, permitindo a utilização deste modelo para estudar a ação e eficácia de compostos (WILMANN, 2012).

2.4 ÁCIDO URSÓLICO

O Ácido Ursólico (AU) é um ácido carboxílico triterpenóide pentacíclico, cujo peso molecular é de 456,7 g/mol. Derivado de um composto natural é encontrado na maioria das plantas e frutas, folhas de *Origanum vulgare* (orégano), folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* (eucaliptos), folhas de *Coffea arabica* (café) e principalmente na *Pyrus malus* (casca da maçã) (FRIGUETTO, 2008; KATASHIMA, 2017).

Faz parte da dieta humana sendo utilizado como aditivos em bebidas, alimentos, cosméticos. Possui um grande potencial biológico, tais como antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, anti-inflamatórios, apresentando uma baixa toxicidade (BAHRAMI, 2016; IKEDA et al., 2008; OGASAWARA et al., 2013; DAR, 2016).

Kunkel et al (2012) estudou a suplementação de AU, durante cinco semanas, na dieta de camundongos em que foram submetidos a desnervação cirúrgica dos músculos do membro posterior esquerdo por transecção do nervo ciático. A suplementação com AU diminuiu significativamente a perda muscular e houve um aumento no tamanho das fibras musculares. O tratamento com AU, também inibiu fatores de transcrição que promovem a atrofia, induzindo a expressão do gene

atrofina-1, MuRF1 e ZFAND5 para o trofismo muscular de camundongos e também os receptores de IGF-1 (KUNKEL et al., 2011).

Lee et al (2017), estudou a utilização do AU na artrite reumatoide, o qual promoveu uma diminuição nos sintomas da artrite, além de reduzir significativamente algumas citocinas inflamatórias, sendo seus efeitos comparados ao do fármaco em estudo, a dexametasona.

Katashima et al (2017), observou que AU induziu hipertrofia muscular, melhorando o tamanho das fibras musculares de contração rápida e fibras oxidativas de contração lenta, aumentando a capacidade física de camundongos, diminui a obesidade. Dessa forma, este composto natural pode ser um importante alvo terapêutico no controle de atrofia muscular, distrofias musculares, para tratamento de doenças que envolvem processos inflamatórios, perda da massa, força, e principalmente da função muscular.

3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

A importância deste trabalho aplica-se na possibilidade do ácido ursólico (AU) promover a inibição da atrofia muscular, o aumento da massa muscular e a melhora da função muscular nos camundongos mdx. Uma vez observado este benefício, poderemos sugerir que o AU apresenta potencial para atuar na principal consequência da DMD, a perda função muscular, que progressivamente leva a morte do paciente. Esperamos que os resultados obtidos neste trabalho possam direcionar pesquisas para futuras aplicações em seres humanos acometidos pela DMD.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com ácido ursólico (10mg/Kg) durante o período de 4 semanas em camundongos mdx por meio da mensuração da força muscular, dosagem dos níveis séricos de creatinofosfoquinase (CPK), análise histopatológica e das citocinas fibrogênicas TNF- α , TGF- β .

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Avaliar semanalmente a força muscular dos camundongos mdx, durante o período de suplementação de AU, por meio do Teste de tela invertida de 1,1 Kondziela;

2- Verificar a intensidade de lesão muscular nos camundongos mdx, ao final do período de suplementação com AU, por meio da dosagem de CPK.

3- Analisar histopatologicamente os músculos: extensor longo dos dedos (ELD), tibial cranial (TA) e diafragma (DIA) de todos os grupos (tratado e controle); verificando a morfologia das fibras e quantificação de células nucleadas centralmente por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), e visualização das fibras colágenas por Tricromo de Masson (TM).

4- Analisar a expressão gênica das citocinas fibrogênicas, TNF- α e TGF- β , nos músculos ELD, TA e DIA de todos os grupos (tratado e controle), por meio de qRT-PCR (reação quantitativa de polimerase em cadeia em tempo real).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Bioética desta Faculdade, protocolo número 6862041016 e pela Faculdade de Medicina do ABC – Santo André/SP, número 07/2016 (anexo A), estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de ética no uso de animais – CEUA”

da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil e da Faculdade de Medicina do ABC.

5.1 MATERIAIS

Foram utilizados 20 camundongos mdx (*Mus musculus* linhagem C57/BL mdx), machos, idade entre 6 a 8 semanas, entre 20 a 30 gramas, que foram doados pelo biotério da Faculdade de Medicina do ABC - FMABC (anexo B). Os animais foram divididos em três grupos experimentais:

Grupo controle (C) (solução fisiológica): camundongos mdx que receberam por gavagem apenas soro fisiológico (n = 4);

Grupo controle (C óleo) (óleo): camundongos mdx que receberam por gavagem apenas o veículo de diluição do ácido ursólico (óleo de milho) (n = 6);

Grupo Tratado (AU): camundongos mdx suplementados, por gavagem, com dose de 10mg/kg de AU diluído no veículo (óleo de milho) (n = 10), de acordo com Sundaresan, Radhiga e Pugalendi, (2016).

Os tamanhos dos grupos experimentais deste trabalho foram eleitos de acordo com a necessidade de balancear uma análise estatística com potencial para gerar dados sólidos, em ordem de verificar ou rejeitar a hipótese experimental deste trabalho. O número de animais estipulados está de acordo com as recomendações descritas pelo TREAT-NMD e por Collins e Morgan, 2003; Perrin, 2014 e Denayer, Stohr e Van Roy, 2014 sobre o uso do modelo mdx em estudos experimentais.

O Ácido Ursólico foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Company - Saint Luis, MO, EUA. Foi administrado a dose de 10mg/kg (SUNDARESAN, RADHIGA, PUGALENDI, 2016) de peso somente no grupo de mdx tratado a partir da quarta semana de vida, durante o período de 4 semanas.

Para a realização do Teste de Kondziela (teste de força), foi adaptado os protocolos de CARLSON; VAN PUTTEN; AARTSMA-RUS, 2011 e DEACON, 2013.

5.2 MÉTODOS

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina do ABC com água e alimentação *ad libitum*.

5.2.1 Metodologia utilizada para aplicar o Teste de Kondziela

O **Teste de Kondziela** foi realizado semanalmente, nos três grupos experimentais, com adaptação dos protocolos de CARLSON; VAN PUTTEN; AARTSMA-RUS, 2011 e DEACON, (2013), ambos validados pelo TREAT-NMD, Neuromuscular Network, (www.treat-nmd.eu/research/preclinical/dmd-sops/). O teste iniciava em ambientação dos animais, por 15-20 minutos, em sala diferente daquela de criação. O teste foi realizado em caixa apropriada (Figura 2), onde um único camundongo era colocado sobre a tela e esta era invertida sobre a cama de maravalha. O início da contagem do tempo, 5 minutos, se iniciava quando a tela ainda estava em 90º graus de inclinação. Quando o animal desprendia da tela, antes do tempo limite, duas novas tentativas eram realizadas, com intervalo de no mínimo 2 minutos entre cada tentativa. Atingido o tempo máximo o animal era desprendido da tela. O teste de força era mensurado por meio do tempo máximo que o animal permanecia agarrado a tela.

Figura 2 – Dimensões da caixa e altura da cama para a realização do Teste de Kondziela, como descrito nos protocolos (Deacon, 2013; Carlson, 2016).

TESTE DE KONDZIELA

Cuidados durante a mensuração da força

Fonte: CARLSON, 2016

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017; CARLSON, 2016).

5.2.2 Metodologia para avaliação dos níveis séricos de Creatinofosfoquinase (CPK)

Após as 4 semanas de suplementação com AU, todos os animais foram eutanasiados com uma overdose anestésica de Tiopental sódico 100 mg/Kg, via intraperitoneal. Posteriormente, a cavidade abdominal foi aberta e a veia cava caudal puncionada para coleta de sangue para mensuração dos níveis séricos da CPK. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos apropriados e imediatamente encaminhados para análise no Laboratório de Análises da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC. A creatinofosfoquinase é uma proteína encontrada no músculo cardíaco e esquelético. Os níveis séricos de CPK são rotineiramente utilizados como um indicador de dano muscular em camundongos distróficos e são mesmo utilizados como uma ferramenta de diagnóstico na DMD humana. Os níveis desta proteína muscular são medidos no soro sob o pressuposto de que o aumento dos níveis séricos de CPK no sangue são representativos do aumento do dano muscular (NAGARAJU; GORDISH, 2014).

5.2.3 Metodologia para coleta dos músculos

A coleta foi realizada logo após a eutanásia (figura 3) e em seguida, os músculos diafragma (DIA), extensor longo dos dedos (ELD) e o tibial cranial (TA) foram isolados, cobertos com talco e congelados em nitrogênio líquido, para posterior análise histológica. Cortes de 5 µm foram realizados em criostato (MTC – Biomicro), transferidos para lâminas de vidro silanizadas (StarFrost, Knitel Glasser, Alemanha) e armazenadas a -20° C até o momento do uso.

Figura 3 – Imagem da coleta do material para análise da expressão gênica. Em **A**, camundongo mdx após a eutanásia, com exposição dos músculos da perna. Em **B**, (seta preta) músculo tibial cranial e em **C**, (seta preta), músculo extensor digital longo.

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

5.2.4 Metodologia para a Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e contagem dos núcleos centrais

A coloração de HE foi utilizada para análise histopatológica do músculo distrófico, mensurando-se o diâmetro Ferret (medida do diâmetro total da fibra) e determinando as áreas de inflamação e regeneração, cuja inflamação se apresenta por meio de intensos infiltrados inflamatórios, e a regeneração muscular pela contagem dos núcleos centrais, que são característicos das fibras musculares regeneradas.

A contagem dos núcleos centrais foi realizada por meio do programa ImageJ (versão 1.39u), sendo utilizado o plugin “*cell counter*”.

5.2.5 Metodologia para análise do Tricromo de Masson

A coloração de Tricromo de Masson tem por finalidade identificar as fibras colágenas, onde se cora as fibras colágenas em azul, e o músculo, citoplasma em vermelho. Dessa forma, essa coloração foi utilizada para visualização das fibras colágenas, cuja representação se faz por acúmulo de tecido conjuntivo. As lâminas foram fotomicrografadas em Microscópio Nikon Eclipse 80i do CADI (Centro Avançado de Diagnóstico de Imagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP.

5.2.6 Metodologia para análise das citocinas fibrogênicas

As análises das citocinas fibrogênicas TNF- α , TGF- β por Reação em cadeia mediada pela Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR), foram realizadas no Laboratório de Análises da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC. Para esta análise foram extraídos o RNA dos músculos ELD, TA e DIA, utilizando o reagente Trizol (#15596-026, Ambion, EUA), a transcrição reversa para cDNA foi realizada com o Quanti-Nova Reverse Transcription Kit (#205410, Qiagen, EUA) ambas segundas recomendações do fabricante. Para cada reação de RT-qPCR foram utilizadas 7,5 μ L de SyBr Green PCR master mix (#4344463, Invitrogen, EUA), 1,0 de mM de cada primer; 2,0 μ L de cDNA e água ultrapura para um total de 15 μ L. Foi utilizado o programa de ciclagem padrão do 7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies, EUA).

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises descritivas dos dados paramétricos, normalizados pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A comparação entre três grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA; $p \leq 0,05$), seguida do pós-teste de Bonferroni.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DA CREATINOFOSFOQUINASE (CPK)

Os níveis de creatinofosfoquinase foram reduzidos no grupo tratado com AU, em cerca 28%, porém não havendo diferença estatística (Gráfico 1). A avaliação dos níveis de creatinofosfoquinase é um parâmetro já estabelecido como indicador de dano muscular segundo NAJARU; GORDISH, 2014, onde o aumento dos níveis de CPK no sangue são sinais representativos de dano.

Dessa forma analisando o gráfico, vimos uma diminuição da CPK no grupo tratado, sugerindo que o AU esteja implicado na diminuição da lesão muscular.

Gráfico 1 – Níveis de creatinofosfoquinase em camundongos mdx dos grupos controle solução fisiológica (branco), controle óleo (rajado) e tratados com AU (preto). Não houve diferença estatística entre os grupos para esta análise.

6.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As fibras musculares dos animais dos grupos controle (solução fisiológica e óleo) mostram um padrão morfológico típico da musculatura distrófica, fibras de diâmetros variáveis, presença de focos de necrose, intenso infiltrado inflamatório. Em relação a morfologia, as miofibras eram hipertróficas e de tamanho irregular, indicando processo de degeneração, assim como descrito por MIYATAKE (2016).

6.2.1 Análise Macroscópica

As fibras musculares estriadas esqueléticas ou miofibras têm a forma de longos cilindros, que podem ter o comprimento do músculo a que pertencem. São multinucleadas e os núcleos se situam na periferia da fibra, junto à membrana celular. São células alongadas especializadas em contração e se organizam da seguinte maneira: o epimísio, é uma camada de tecido conjuntivo denso que embainha o músculo inteiro. O perimísio deriva do epimísio e circunda os feixes ou fascículos das células musculares. O endomísio é uma camada delicada de fibras reticulares e de matriz extracelular que circunda cada célula muscular (KIERSENBAUM, 2016).

Histologicamente, a fibra muscular íntegra é caracterizada por formato poligonal, citoplasma eosinófilo e núcleo periférico. A fibra muscular em regeneração apresenta núcleo central com aspecto vesicular, citoplasma geralmente basófilo, refletindo alta síntese proteica e escassez de elementos contráteis. Já a fibra muscular completamente regenerada é caracterizada pelos núcleos centrais, citoplasma eosinófilo e aumento da relação citoplasma/núcleo (ENGEMBE et al, 2016; KIERSENBAUM, 2016).

Figura 4 – Músculo normal, apresentando epimísio (membrana de tec. conjuntivo que envolve o músculo; perimísio (dividem as fibras em feixes); endomísio (fina camada que envolve cada fibra).

Fonte: (Diet e exercise, acesso em maio 2017).

A musculatura distrófica apresenta variações no tamanho da fibra muscular, infiltração de tecido conjuntivo e adiposo e elevado nível de CPK. A DMD é caracterizada pela presença de grupos focais de miofibras necróticas e hipertrofia muscular, possuindo ciclos de degeneração, inflamação e a substituição da musculatura por tecido adiposo, criando por exemplo a pseudo-hipertrofia da panturilha (DESGUERRE, 2015).

O aumento progressivo da fibrose intersticial e dos focos inflamatórios no músculo acaba impedindo a migração das células miogênicas, as quais são necessárias para a formação muscular (VANDENABEELE, 2010).

6.2.2. Análise Histológica

O material foi coletado logo após a eutanásia dos animais, congelados, sendo posteriormente armazenados em botijão de nitrogênio líquido na Faculdade de Medicina do ABC. Para proceder a análise histológica, cortes de 5 µm foram realizados em criostato (MTC – Biomicro), transferidos para lâminas de vidro silanizadas (StarFrost, Knitel Glasser, Alemanha) e armazenadas a -20° C até o momento do uso.

6.2.2.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

Foi utilizada esta coloração para avaliação da área da secção transversa das fibras musculares e obtenção do percentual da área de cada fibra muscular contando as fibras com núcleo central, sendo estes característico de fibras musculares regeneradas. A inflamação foi analisada cuja representação se faz por intenso infiltrado inflamatório, as áreas de tecido adiposo marcadas por círculos vermelhos, onde essas interpretações e análises são descritas por GROUNDS, 2014.

O primeiro analisado, o músculo diafragma (DIA) apresentou no grupo controle tanto solução fisiológica como óleo, uma grande quantidade de tecido adiposo, o qual são facilmente observados utilizando a coloração HE (GROUNDS, 2014; LESSA, 2012). Este tecido tem uma relação causal no músculo esquelético, o que se reflete principalmente pela diminuição da síntese proteica, aumentando a inflamação induzindo a atrofia muscular (KATASHIMA, 2017). O grupo tratado apresentou uma diminuição deste tecido, como é visto a seguir (figura 5).

Figura 5 – Fotomicrografias do músculo diafragma (DIA), corte transversal apresentando depósito de tecido adiposo (seta preta e círculo vermelho) em **A** (grupo óleo) e **B** (grupo solução fisiológica) apresentam miofibras de tamanho irregular e hipertróficas. Em **C** (grupo tratado), há diminuição deste tecido e miofibras de tamanhos mais regulares.

MÚSCULO DIAFRAGMA

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

O músculo extensor longo dos dedos (ELD) apresentou no grupo controle tanto solução fisiológica como óleo, infiltrado inflamatório e miofibras de diversos tamanhos característicos dos músculos distróficos (GROUNDS, 2014). Já no mdx tratado as fibras se apresentaram mais regulares, com dimensões mais proporcionais e uma diminuição no infiltrado inflamatório (figura 6).

Figura 6 – Fotomicrografias do músculo extensor longo dos dedos (ELD), corte transversal, apresentando em **D** (grupo óleo) miofibras de diversos tamanhos (seta preta), **E** (grupo solução fisiológica) intenso infiltrado inflamatório (seta preta), e **F** (grupo tratado) miofibras mais regulares e diminuição do infiltrado inflamatório.

MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

O músculo tibial cranial (TA) apresentou também em ambos grupos controle infiltrados inflamatórios, um número maior de miofibras irregulares, sendo que no grupo tratado elas apresentam mais regulares e há o surgimento de novas miofibrilas sugerindo a regeneração muscular segundo GROUNDNS, 2014, (figura 7). Estas três musculaturas são bastante estudadas, já que há processos inflamatórios e fibróticos persistentes.

Figura 7 – Fotomicrografias do músculo tibial cranial (TA), corte transversal, apresentando em **G** (grupo óleo) intenso infiltrado inflamatório (seta preta), **H** (grupo solução fisiológica) infiltrado inflamatório e miofibras irregulares (seta preta), e **I** (grupo tratado) miofibras mais regulares, e a **seta amarela** indicando formação de novas fibras.

MÚSCULO TIBIAL CRANIAL

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

6.2.2.2 Análise de fibras com núcleos centrais

A avaliação das fibras contendo núcleos centrais foi realizada pelo programa ImageJ, e a para a contagem utilizou-se o plugin “cell counter”.

As fibras musculares em regeneração são caracterizadas por apresentarem núcleo central, as quais foram encontradas em maior número no grupo tratado com AU, segundo o TREAT-NMD. As lâminas foram coradas com HE e quantificado o número de fibras com núcleos centrais e com núcleo basal. Os resultados obtidos através dessa análise foram expressos em forma de gráfico (gráfico 2) para comparação entre cada grupo aferindo cada musculatura.

As fibras em estágio inicial de regeneração (figura 8), apresentam pequena proporção citoplasma/núcleo, citoplasma fortemente basófilo e núcleo central, como é

descrito (CHANG, 2016). As fibras centralmente nucleadas estiveram em maior número nos grupos tratados com AU, porém apenas o músculo Tibial Cranial e o Diafragma apresentaram uma diferença estatística, sugerindo um aumento da regeneração muscular.

Gráfico 2 – Análise da quantidade de núcleos centrais (NC) presentes em cada musculatura, nos grupos controle solução fisiológica (**C**), controle óleo (**C óleo**) e grupo tratado com ácido ursólico (**AU**). Em todas as musculaturas tratadas pelo AU, houve aumento das fibras centralmente nucleadas, porém apenas os músculos, tibial cranial e diafragma apresentaram diferença significativa, quando comparado o grupo tratado em relação ao controle.

Figura 8 – Fotomicrografia de secção transversal do músculo tibial cranial (TA), tratado com AU. Seta preta indicando a fibra com núcleo central (NC), e inúmeras fibras ao redor com NC, indicativo de regeneração muscular; (seta amarela) mostrando essas novas miofibras que estão em uma área de inflamação e regeneração.

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

6.2.2.3 Tricromo de Masson (TM)

Secção transversal dos músculos Diafragma, extensor longo dos dedos e tibial cranial do camundongo mdx, grupo controle óleo, solução fisiológica e tratado com AU. Após o tratamento todas as musculaturas apresentaram linhas de fibrose,

como é mostrada nas figuras abaixo, porém é perceptível que o grupo tratado apresentou uma diminuição da espessura dessas linhas, e quando analisado o músculo inteiramente, percebe-se esta diminuição.

Figura 9 – Fotomicrografias dos músculos diafragma (DIA), corte transversal, apresentando áreas de fibrose na coloração azul. O DIA é um músculo o qual tem o seu processo de degeneração contínuo, porém nota-se as linhas de fibrose mais espessas em mdx óleo e solução fisiológica (Aumento: 100µm).

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

Figura 10 – Fotomicrografias do músculo extensor longo dos dedos (ELD), corte transversal, apresentando áreas de fibrose na coloração azul.

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

Figura 11 – Fotomicrografias do músculo Tibial cranial (TA), corte transversal, apresentando áreas de fibrose na coloração azul. Observa-se que as áreas de fibrose estão presentes em grandes partes do músculo nos grupos controle, o que se vê no grupo tratado é uma linha de fibrose condensada, porém no restante da musculatura há uma diminuição na marcação de fibrose.

MÚSCULO TIBIAL CRANIAL

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

6.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizou-se cortes tanto transversais como longitudinais, o material que estava congelado foi fixado no paraformol 24h, depois colocado em séries crescentes de álcool iniciando no 50% até o 100%, conforme protocolo. O material foi colocado no aparelho de ponto crítico (Balzers CPD020) e na sequência foram cobertos com ouro por meio de do processo de “sputtering” (EMITEC H K550) e a observação ultra estrutural e a foto documentação realizaram-se em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435VP).

Analisando primeiramente o Diafragma, observou-se que a musculatura do grupo tratado apresentou fibras mais organizadas na sua estrutura comparadas com o grupo controle (solução fisiológica e óleo de milho) (figura 12). A figura 13 mostra os

buracos vistos no arcabouço muscular (**K**) que correspondem a área de infiltrados inflamatórios, fibrose e substituição tecidual, o que não é encontrado no tratado (**L**).

Figura 12 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura do músculo diafragma (DIA), cortes padronizados. Grupo tratado (**B**, **D** e **F**), apresentando fibras mais organizadas, compactas em comparação ao controle (**A**, **C** e **E**).

MÚSCULO DIAFRAGMA

SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

ÁCIDO URSÓLICO

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

Figura 13 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura do músculo diafragma (DIA), cortes padronizados. Grupo tratado (H, J e L), apresentando fibras mais organizadas, além de uma estrutura muscular mais compacta e menos aérea como vista em grupo controle óleo (I, K). Estes espaços por entre as fibras musculares são devido a áreas de fibrose, infiltrados inflamatórios e substituição tecidual.

MÚSCULO DIAFRAGMA

ÓLEO DE MILHO

ÁCIDO URSÓLICO

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

Figura 14 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura do músculo extensor longo dos dedos (ELD), cortes padronizados. Comparando-se os grupos controle (Solução fisiológica e óleo) com o grupo tratado (AU), o grupo tratado apresenta fibras mais compactas, íntegras e próximas da sua morfologia normal (**seta vermelha**) (I), diferente do que é visto em (B, C, E e F), fibras que parecem estarem se “desmanchando”, apresentando um aspecto de musculatura sem estrutura, estando desestabilizadas devido à ausência da distrofina.

MÚSCULO EXTENSOR LONGO DOS DEDOS

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

Figura 15 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura do músculo Tibial Cranial (TA), cortes padronizados. Comparando-se os grupos controle (Solução fisiológica e óleo) com o grupo tratado (AU), o grupo tratado apresenta fibras mais compactas, mesmo a distrofina estando ausente. Neste músculo percebe-se a estrutura do músculo mais íntegra (**H**), diferente do que é visto em (**B, C, E e F**), fibras as quais devido à ausência da distrofina não conseguem se manter estabilizadas.

MÚSCULO TIBIAL CRANIAL

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

6.3 KONDZIELA TEST (Teste de Força)

Ao início do tratamento os grupos experimentais foram homogeneizados (gráfico 3), não apresentando diferenças significativas entre eles. Para a realização do teste de força foram adaptados dois protocolos validados pelo TREAT-NMD, Neuromuscular Network, (www.treat-nmd.eu/research/preclinical/dmd-sops/).

✓ PESO

Antes de iniciar o tratamento os grupos foram homogeneizados. Os camundongos eram pesados diariamente e a dose era calculada através do peso do camundongo. Dose = 10mg/Kg de AU.

Gráfico 3 – Os animais não apresentam diferença quanto ao peso no início do tratamento (letras iguais) em nenhum dos grupos controle solução fisiológica (C), controle óleo (C óleo) e grupo tratado com ácido ursólico (AU). E também não apresentam diferença entre os grupos ao final. Porém quando se compara o peso inicial com o peso final de cada grupo há diferença entre eles (letras diferentes, a,b). Dessa forma os animais ganharam peso normalmente devido ao seu crescimento, não havendo interferência do AU.

✓ FORÇA

Gráfico 4 – Os grupos foram homogeneizados ao início do tratamento não havendo diferença (letras iguais) na força inicial entre os grupos controle solução fisiológica (C), controle óleo (C óleo) e o grupo tratado com ácido ursólico (AU). O grupo tratado com AU apresenta um ganho de força maior que os

grupos controles. As letras diferentes (a, b) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$), observando que o grupo (C óleo) não apresentou diferença quando analisado a sua força inicial da força final, excluindo a possibilidade de interferência do veículo no tratamento.

Para uma melhor visualização dos dados segue gráficos de colunas comparando o PESO X FORÇA;

Gráfico 5 – Teste de Kondziela em camundongos mdx dos grupos controle solução fisiológica (branco), controle óleo (rajado) e tratados com AU (preto). Em **A**, relação tempo/força na primeira semana de tratamento (grupos homogeneizados). Em **B**, relação tempo/força ao final do experimento. A força final do grupo tratado foi maior estatisticamente em relação ao controle. Em **C**, peso dos animais ao início do tratamento (grupos homogeneizados). Em **D**, a representação do peso dos animais ao final do experimento.

6.4 ANÁLISES DAS CITOCINAS FIBROGÊNICAS TNF- α E TGF- β

A expressão de RNA mensageiro que codifica o TNF- α e o TGF- β foi realizada pela técnica de Transcrição Reversa e Reação em Cadeia mediada pela Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) pelo método de SYBR Green.

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é uma poderosa ferramenta para avaliar expressão gênica devido a sua sensibilidade e especificidade (KUBISTA et al., 2006). A RT-qPCR permite a amplificação, por meio de enzimas, de sequências definidas de RNA, podendo ser usado para comparar os níveis de RNAm, caracterizar seus padrões de expressão, discriminar entre RNAm bastante relacionados e para analisar a estrutura do RNA. O método de RT-qPCR em tempo real trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-qPCR por fluorescência (BUSTIN, 2000).

Essa técnica utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação do alvo é detectada pela primeira vez, dessa forma quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência, que será detectada pelo sistema do corante SYBR Green que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita formado durante a reação, tendo como resultado, o aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR. Esta análise foi realizada juntamente com o Laboratório de Análises Clínicas da faculdade de Medicina do ABC.

A análise foi realizada, dividindo-se os grupos controle e grupo tratado, onde a média do grupo óleo e solução fisiológica eram iguais, se tornando um único grupo controle. O método de cálculo utilizado para a quantificação foi o método de CT comparativo, também referido como $\Delta\Delta Ct$ e determinado pela fórmula: $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{gene endógeno})$. O gene da GAPDH foi utilizado como controle endógeno para verificar a integridade dos cDNAs e padronizar as concentrações iniciais de cDNA de todas as amostras, uma vez que, é expresso de forma constitutiva em todas as células.

O material foi coletado e submetido aos devidos protocolos para esta análise.

Após a coleta do material, este foi congelado e descongelado somente no momento de sua análise. Todas as amostras foram levadas para o Laboratório de Análises Clínicas da FMABC. Em ambiente estéril, o material, depois de separado, será completamente macerado, onde o músculo se torna praticamente um pó.

Figura 16 – Imagem do início do protocolo para extração do RNA. Em (D), colocação do músculo para realização da maceração (E).

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

Concluída a etapa da maceração se inicia o protocolo para extração de RNA, onde usamos o protocolo de extração utilizando como reagente o Trizol (#15596-026, Ambion, EUA), segundas recomendações do fabricante.

Figura 17 – Músculo macerado (F), sequência do protocolo (G).

Fonte: (SILVEIRA, A. C., 2017).

Após a extração do RNA, utilizamos o protocolo SuperScript® IV Reverse Transcriptase (anexo C), para formar uma fita simples de cDNA e assim iniciar a amplificação dos genes alvo TNF- α e TGF- β e o endógeno GAPDH, que será o controle. Para cada reação de RT-qPCR foram utilizadas 7,5 μ L de SyBr Green PCR master mix (#4344463, Invitrogen, EUA), 1,0 de mM de cada primer; 2,0 μ L de cDNA

e água ultrapura para um total de 15µL. Foi utilizado o programa de ciclagem padrão do 7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies, EUA).

O GAPDH foi o gene utilizado para normalização da reação, finalizadas as corridas, terminadas as análises, obtivemos o seguinte gráfico, onde houve uma diminuição dos genes alvos após o tratamento com AU.

No presente estudo a citocina inflamatória TNF- α apresenta diminuída, porém não houve diferença estatística e o TGF- β diminuiu estatisticamente em relação ao grupo controle (gráfico 6), lembrando que a inflamação e a fibrose muscular são uma das principais características morfológicas encontradas no músculo distrófico as quais dificultam e impedem que novas terapias tenham sucesso, por exemplo a dificuldade que se encontra para se alongar e fortalecer um músculo com uma grande quantidade de tecido fibrótico.

Gráfico 6 – Análise das citocinas fibrogênicas, o qual representa que tanto a expressão do TNF- α quanto do TGF- β diminuíram com o tratamento do AU, porém apenas a diminuição do TGF- β teve diferença estatística. Podendo sugerir que este composto diminuiu a inflamação e fibrose da musculatura esquelética.

7 DISCUSSÃO

Na distrofia muscular, apesar da distrofina estar ausente em todos os músculos estriados esqueléticos e cardíacos, vale frisar que o comprometimento muscular não ocorre uniformemente entre as musculaturas, mas sim em desigualdade, onde uma musculatura poderá ser mais atingida comparada com outra, acometendo tanto os humanos como os camundongos mdx (FERRETTI et al., 2009). Isto sugere que outros mecanismos além da ausência da distrofina, colaboram para a gênese da doença.

A deficiência de distrofina associada à distrofia muscular de Duchenne (DMD) resulta em inflamação crônica e degeneração muscular grave, onde a extensão da fibrose e inflamação muscular também contribui para a gravidade da doença (MURPHY, 2016; JURADO et al, 2017). O único tratamento farmacológico estabelecido para DMD é a utilização dos glicocorticoides para suprimir a inflamação muscular. No entanto este tratamento é limitado pela sua eficácia terapêutica insuficiente e efeitos colaterais consideráveis (MIYATAKE, et al., 2016).

Os camundongos mdx foram escolhidos para esta pesquisa por serem de uma linhagem isogênica, e um dos modelos mais utilizados para o estudo da distrofia muscular, apesar de apresentarem um fenótipo mais leve quando são comparados com os pacientes com DMD (PELOSI, et al, 2017). Devido a sua linhagem ser isogênica há um facilitador para analisar os resultados, sendo o próprio mdx o controle negativo para o estudo dos efeitos do AU sobre a musculatura distrófica.

Assim, esta pesquisa estudou os efeitos do ácido ursólico no camundongo mdx de 6 – 8 semanas de vida durante quatro semanas de tratamento utilizando o ácido ursólico (AU) diariamente. Esta idade corresponde aos picos de necrose, inflamação e fraqueza muscular (McGREEVY et al, 2015), dessa forma realizando o tratamento numa fase de intensa degeneração muscular, permitindo avaliar quais seriam os efeitos deste composto natural.

O AU vem sendo estudado com ênfase nessa última década, devido ao seu tamanho potencial terapêutico. Neste trabalho utilizamos o AU como hipótese de este atuar como um agente anti-inflamatório e anti-fibrótico, podendo ter importância na terapia farmacológica da DMD. Durante o tratamento, verificamos que nenhum animal apresentou efeito adverso ou colateral, sendo o AU um composto de fácil

administração. Os animais estudados apresentaram ganho de peso durante todo o tratamento. O peso dos animais foi controlado diariamente, pois para a administração do AU, era necessário sabê-lo, já que a dose era calculada por mg/Kg. No início do tratamento os grupos foram homogeneizados, e ganharam peso ao decorrer das semanas de tratamento, sendo estatisticamente diferentes quando se compara o peso final ao inicial.

O teste de força muscular foi realizado semanalmente, onde a força foi mensurada com adaptação dos protocolos de CARLSON; VAN PUTTEN; AARTSMARUS, 2011 e DEACON, 2013, protocolos estes validados pelo TREAT-NMD, sendo bastante utilizado em pesquisa aos quais se quer avaliar a força muscular destes camundongos. Antes da realização do teste de Kondziela (teste de força), esses animais eram colocados em outro ambiente, para ambientação, e utilizado a adaptação dos protocolos como já foi descrito.

Como resultado, a relação da força final do grupo tratado foi estatisticamente maior em relação ao grupo controle, houve diferença estatísticas nos grupos controle solução fisiológica e no grupo tratado com AU. O grupo controle solução fisiológica, e o grupo óleo apresentaram aumento da sua força, sendo que o grupo óleo não apresentou diferença estatística, excluindo a possibilidade de qualquer alteração feita pelo veículo, mas analisando os parâmetros e o gráfico vemos um aumento da força, onde segundo McGREEVY, 2015, após o período de necrose muscular e intensa fraqueza, algumas alterações retrocedem espontaneamente, pela capacidade regenerativa do camundongo mdx, onde apenas o Diafragma continua em permanente processo de degeneração. Apesar de o processo de regeneração ainda não estar completamente elucidado, é sabido que este processo para quando há o esgotamento de algumas células satélites, sendo a musculatura danificada e substituídas por tecidos fibrosos e adiposos, comprometendo toda a função muscular (CARVALHO, 2017).

O grupo tratado com AU apresentou um aumento de força significativamente maior, condizendo com a análise morfológica das musculaturas, onde as fibras se apresentavam mais organizadas, mais estruturadas, com diminuição de depósitos de tecido adiposo e infiltrados inflamatórios, diferentemente de ambos grupos controle. O ácido ursólico contribuiu para a estabilidade da fibra muscular, onde os animais tratados tiveram uma resposta na força maior que os do grupo controle, sugerindo uma proteção da fibra muscular.

Analisando o gráfico o AU diminuiu os níveis da creatinofosfoquinase, mas não houve diferença estatística. A avaliação dos níveis de CPK é um parâmetro já estabelecido como indicador de dano muscular segundo NAJARU; GORDISH, 2014, onde o aumento desses níveis no sangue são sinais representativos de lesão.

Quanto a morfologia das fibras musculares utilizando a coloração de HE, percebemos nas três musculaturas estudadas, no Diafragma (DIA), Tibial Cranial (TA) e Extensor Longo dos Dedos (ELD), uma diminuição do tecido adiposo, da quantidade de infiltrados inflamatórios, e a presença de miofibras mais regulares, além de uma maior quantidade de fibras em regeneração. Analisando a sua ultraestrutura pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), o grupo tratado apresenta fibras mais compactadas e íntegras. Houve um aumento das fibras com núcleos centrais, estes característicos das fibras que apresentam regeneração muscular, porém, apenas os músculos ELD e DIA apresentaram diferença estatística quanto ao seu aumento.

A coloração do Tricromo de Masson, permite analisar a fibrose presente na musculatura, onde as fibras colágenas ficaram marcadas de azul. Após o tratamento todas as musculaturas apresentaram linhas de fibrose, porém é perceptível que o grupo tratado apresentou uma diminuição da espessura dessas linhas. Observando o músculo inteiro, as regiões de intensa fibrose foram diminuídas no grupo tratado, diferentemente do grupo controle que apresentam regiões vastas de fibrose.

Correlacionando o achado da diminuição da fibrose com a expressão da citocina fibrogênica TGF- β , o qual está envolvido na formação de fibrose (Budasz-Swidarska et al., 2005), vimos que esta diminuiu sua expressão no grupo tratado com AU. O TGF- β é sintetizado por diversos tipos celulares, tais como células endoteliais, plaquetas, células T e macrófagos e está envolvido na proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (Roberts & Sporn, 1987). Níveis elevados de TGF- β são marcadores de fibrose (BURKS; COHN, 2011; HUEBNER et al., 2008; KLINGLER et al., 2012), e são observados em maior concentração nos músculos distróficos do que em relação a músculos normais (GOSSELIN; MCCORMICK, 2004; GRAHAM et al., 2010). É ativada em resposta ao fibrinogênio sendo produzida pelos macrófagos e liberadas durante a fase de inflamação (ROBERTSON et al., 1993). Afeta negativamente a regeneração muscular pela inibição da proliferação das células satélites, impedindo a fusão dos miotúbulos e diferenciação dos miócitos (BURKS; COHN, 2011). A substituição compensatória do músculo por tecido fibrótico e adiposo

ocorre secundário à falta da distrofina e é seguida de mionecrose (BEMASCONI et al., 1995).

No presente estudo houve uma diminuição da expressão desta citocina, calculada pela média, em relação ao grupo controle, a qual foi normalizada pelo gene GAPDH, este um gene endógeno, que foi expresso de maneira similar em todos os grupos. Enfim, a fibrose muscular é uma das principais características morfológicas encontradas no músculo distrófico as quais dificultam e impedem que novas terapias tenham sucesso, por exemplo a dificuldade para se alongar e fortalecer um tecido fibrótico e quanto ao nível de terapias celulares, deixando a musculatura ao dificultar a migração de células indiferenciadas.

Outra citocina importante no papel da regulação do processo inflamatório a qual também teve sua expressão diminuída pelo tratamento é o TNF- α . O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória precoce e potente que estimula a resposta inflamatória. Mesmo um pequeno trauma para o músculo aumentará os seus níveis. É produzida por neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos que se acumulam rapidamente no local da lesão. Embora as mutações da distrofina representem a principal causa de DMD, os processos secundários envolvendo a inflamação persistente, deterioração da regeneração muscular são fatores agravantes para a doença (SALAM, MEGUID e KORRAA, 2009).

Níveis elevados de TNF- α são tipicamente observados em músculos distróficos (GROUNDS; TORRISI, 2004; MACHADO et al., 2011). Essa citocina tem um importante papel na regulação da inflamação crônica, pois em altas concentrações ou exposições crônicas, induzem a mionecrose (KRYSKO; VANDENABEELE, 2010; TSUJINAKA et al., 1996; VANDENABEELE et al., 2010). A análise foi realizada de acordo com os grupos tratado e controle e não pela musculatura específica, dessa forma os resultados apresentados são de acordo com cada grupo estudado neste trabalho e não pelas musculaturas individualmente. O gene endógeno GAPDH teve sua expressão similar para todos os grupos, não havendo diferença estatística entre eles.

Analisando assim a expressão das duas citocinas, somente o TGF- β teve estatisticamente sua expressão diminuída após o tratamento com AU. Mas, analisando o gráfico que representa a expressão do TNF- α vemos uma diminuição da expressão, porém sem apresentar diferença estatística. Sugerimos após essas análises que o AU apresenta um grande potencial terapêutico, aumentando a força e

regeneração muscular, organizando a estrutura da fibra e diminuindo a expressão de fatores que induzem a fibrose e inflamação.

Dessa forma, tendo em vista esses benefícios do AU, pois além de ser um composto natural minimizando possíveis efeitos colaterais, possui fácil administração e uma gama de potenciais terapêuticos, inclusive como é sugerido por esta pesquisa ser um forte composto para um possível tratamento dos pacientes portadores de distrofia muscular.

8 CONCLUSÕES

- ✓ O tratamento utilizando o ácido ursólico (AU) aumentou estatisticamente a força dos camundongos mdx;
- ✓ Houve uma diminuição dos níveis de creatinofosfoquinase em cerca de 28%, porém não havendo diferença estatística;
- ✓ Os músculos analisados neste trabalho (TA, ELD e DIA) responderam de forma similar ao tratamento com ácido ursólico; apresentando miofibras mais regulares e de tamanhos mais homogêneos, diminuição de tecido adiposo, do infiltrado inflamatório e das áreas de fibrose e houve aumento das miofibras com núcleos centrais.
- ✓ Diminuição da expressão das citocinas fibrogênicas TNF- α e TGF- β no grupo tratado com AU, sugerindo um possível efeito protetor contra a degeneração e inflamação muscular.

REFERÊNCIAS

- AARTSMA-RUS, A.; GINJAAR, I.B.; BUSHBY, K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Medical Genetics**. v. 53, n. 3, p. 145-151, 2016.
- ARAUJO, A. P. Q. C.; DECO, M. C.; KLÔH, B. S.; COSTA, M. R.; GÓIS, F. V.; GUIMARÃES, A. F. C. M.; Diagnosis delay of duchenne muscular distrophy. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, n. 2, p. 179-183, 2004.
- BAHRAMI, S.A.; BAKHTIARI, N. Ursolic acid regulates aging process through enhancing of metabolic sensor proteins level. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 82, p. 8-14, 2016.
- BAKHTIARI, N.; HOSSEINKHANI, S.; SOLEIMANI M.; HEMMATI, R.; NOORI-ZADEH, A.; JAVAN, M.;TASHAKOR, A. Short-term ursolic acid promotes skeletal muscle rejuvenation throughenhancing of SIRT1 expression and satellite cells proliferation. **Biomedicine&Pharmacotherapy**. v. 78, p. 185-196, 2016.
- BERNE, R. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 236-237.
- BOCA, S.M.; NISHIDA, M., HARRIS, M., Rao, S., CHEEMA, A.K.; GILL, K., et al. Discovery of metabolic biomarkers for Duchenne muscular dystrophy within a natural history study. **PLoS One**. 2016.
- BUDASZ-SWIDERSKA, M.; JANK, M.; MOTYL, T. Transforming growth factor- β 1 upregulates myostatin expression in mouse C2C12 myoblasts. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, supp. 3, p. 195-214, 2005.
- BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A.; MOORE, K. J. X chromosome linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 84, n. 4, p.1189- 1192, 1984.
- BURKS, T. N.; COHN, R. D. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, p. 19, jan. 2011.
- CAROMANO, F. A. C. Características do portador de distrofia muscular de duchenne (DMD). **Arquivos de Ciências de Saúde de Unipar**, v. 3, n. 3, p. 211-218, 1999.
- CARVALHO, S. C.; HINDI, S. M.; KUMAR, A.; MARQUES, M. J. Effects of omega-3 on matrix metalloproteinase-9, myoblast transplantation and satellite cell activation in dystrophin-deficient muscle fibers. **Cell Tissue Res. Springer**. June, 2017.
- CARLSON, G.; VAN PUTTEN, M.; AARTSMA-RUS, A. The use of four limb hanging tests to monitor muscle strength and condition over time. 2011.
- CICILLOT, S. et al. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2191–9, out. 2013

CHAMBERLAIN, J. S.; METZGER, J.; REYES, M.; TOWNSEND, D.; FAULKNER, J. A. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 9 p. 2195-204, 2007.

CHANG, N. C.; CHEVALIER, F. P.; RUDNICKI, M. A. Satellite Cells in Muscular Dystrophy – Lost in Polarity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 479–496, 2016.

CHEN, Y.W.; NAGARAJU, K.; BAKAY M.; McINTYRE, O.; RAWAT, R.; SHI, R.; HOFFMAN, E.P. Early onset of inflammation and later involvement of TGF beta in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 65, n. 6, p. 826-834, 2005.

CRUZ, M. A. et al. Potential therapeutic impact of omega-3 long chain-polyunsaturated fatty acids on inflammation markers in Duchenne muscular Q3 dystrophy: A double-blind, controlled randomized trial. **Clinical Nutrition**, v. 1/12, 2017.

DAR, B. A. et al. Synthesis and screening of ursolic acid-benzylidene derivatives as potential anti-cancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 111, p. 26–32, 23 mar. 2016.

DEACON, R. M. J. Measuring the strength of mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 76, 2 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770643>>. Acesso em: 21 dez. 2016.

DECONINCK, N.; TINSLEY, J.; De BACKER, F.; FISHER, R.; KAHN, D.; PHELPS, S.; DAVIES, K.; GILLIS, J. M. Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin deficient muscles of mice. **Nature Medicine**, v. 1, n. 3, p.1216-1221, 1997.

DEEPHA, S., et al. MLPA identification of dystrophin mutations and *in silico* evaluation of the predicted protein in dystrophinopathy cases from India. **BMC Medical Genetics**, BMC series – open, Jun. 2017.

DESGUERRE, I.; LAUGEL, V. Diagnostic et histoire naturelle de la dystrophie musculaire de Duchenne. **Archives de Pédiatrie**, v. 22, n. 12, p. 12S24-12S30, 2015.

DIAMENT, A.; CYPEL, S. **Neurologia Infantil**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1113-1131.

DUAN, D. Duchenne muscular dystrophy gene therapy in the canine model. **Human Gene Therapy Clinical Development**, v. 26, n. 1, p. 57-69, 2015.

DUCLOS, F.; STRAUB, V.; MOORE, S. A.; VENZKE, D. P.; HRSTKA, R. F.; CROSBIE, R. H.; DURBEEJ, M.; LEBAKKEN, C. S.; ETTINGER, A. J.; VAN DER MEULEN, J.; HOLT, K. H.; LIM, L. E.; SANES, J. R.; DAVIDSON, B. L.; FAULKNER, J. A.; WILLIAMSON, R.; CAMPBELL, K. P. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v. 142, n. 6, p. 1461-1471, 1998.

ENGEMBE, J.-P. et al. Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method. **Molecular**

Therapy-Nucleic Acids, v. 5, n. 1, p. e283, 26 jan. 2016.

FERRETTI, R. et al. Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient mdx mice. **Muscle & Nerve**, v. 39, n. 5, p. 609–15, 2009.

FITZHUGH, H.A. Analysis of growth curves and strategies for altering their shape. **J. Anim. Sci.** 42: 1036-1051, 1976.

FLANIGAN, K.M.; Duchenne and Becker muscular dystrophies. **Neurol Clinic.** 2014.

FRIGHETTO, R. T. S. et al. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 767–771, jan. 2008.

GROSSMAN, M. E BOHREN, B.B. Logistic growth curve of chickens: heritability of parameters. **J. Hered.** 76: 459-462. 1985.

IYOMBE-ENGEMBE, J.-P.; OUELLET, D. L.; BARBEAU, X.; ROUSSEAU, J.; CHAPDELAINE, P.; LAGÜE, P.; TREMBLAY, J. P. Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method. **Molecular Therapy—Nucleic Acids**, v. 5, n. 1, p. e283, 26 jan. 2016.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 1, p. 26–42, jan. 2008.

JURADO, P. P. et al. Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy. **Elsevier**. Vol. 187, n. 8, pg 1814–1827, 2017.

KATASHIMA, C. K.; SILVA, V. R.; GOMES, T.L.; PICHARD, C.; PIME, G. D.; Ursolic acid and mechanisms of actions on adipose and muscle tissue: a systematic review. **Obesity reviews**. January. 2017.

KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L.; Histologia e Biologia Celular – Uma introdução à Patologia. **Elselvier**, 4 edição, 2016.

KLINGLER, W. et al. The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : **official journal of the Mediterranean Society of Myology**, v. 31, n. 3, p. 184–95, dez. 2012.

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Journal of Neurological Science**, v. 166, n. 2, p. 115-121, 1999.

KUNKEL, S. D. et al. mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. **Cell metabolism**, v. 13, n. 6, p. 627–38, 8 jun. 2011.

KUNKEL, S. D. et al. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39332, jan. 2012.

LEE, J.Y.; et al. Anti-inflammatory effects of ursolic acid-3-acetate on human synovial fibroblasts and a murine model of rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 49, p. 118-125, jun. 2017.

LESSA, T. B.; CARVALHO, R. C.; FRANCIOLLI, A. L. R.; OLIVEIRA, L. J.; BARRETO, R. S.; FEDER, D.; BRESSAN, F. F.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Muscle reorganisation through local injection of stem cells in the diaphragm of mdx mice. **Acta Veterinária Scandinavica**, v. 54, n. 1, p. 1-7, 2012.

<http://lifineucb.blogspot.com.br/2016/04/distrofia-muscular-de-duchenne-dmd.html>

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, n(1–2), p. 92–94, 2005.

MCKANE, M.; SOSLOW, J. H.; XU, M.; SAVILLE, B. R.; SLAUGHTER, J. C.; BURNETTE, W. B.; MARKHAM, L. W. Does Body Mass Index Predict Premature Cardiomyopathy Onset for Duchenne Muscular Dystrophy? **Journal of Child Neurology**, p. 88307381668742, 13 jan. 2017.

MASSO, DI R.J., SILVA, P.S E FONT, M.P. Asymptotic weight and maturing rate in mice selected for body conformation. **Genetics and Molecular Biology**. 23, 2, 335-340.2000.

McGREEVY, J. W.; HAKIM, C. H.; McINTOSH, M. A.; DUAN, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. **Disease Models and Mechanisms**, v. 8, n. 3, p. 195-213, 2015.

MIYATAKE, S.; SHIMIZU-MOTOHASHI, Y.; TAKEDA, S.; AOKI, Y. Anti-inflammatory drugs for Duchenne muscular dystrophy: focus on skeletal muscle-releasing factors. **Dove Press**, v.10, p. 2745 – 2758, 2016.

MURPHY, S.; OHLENDIECK, K. The biochemical and mass spectrometric profiling of the dystrophin complexome from skeletal muscle. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 20–27, 2016.

NAGARAJU, K.; GORDISH, H. Serum Creatine Kinase analysis in mouse models of muscular dystrophy. **TREAT-NMD Neuromuscular Network**. March. 2014

NAKAMURA, A; TAKEDA, S. Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2011, n. 2011, p. 184393, 2011.

NIKS, E. H. & AARTSMA-RUS, A. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 17, n. 2, pg. 225 - 236, 2017.

OGASAWARA, R.; SATO, K.; HIGASHIDA, K.; NAKAZATO, K.; FUJITA, S. Ursolic acid stimulates mTORC1 signaling after resistance exercise in rat skeletal muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 305, n. 6, p. E760-5, 15 set. 2013.

PELOSI, L., et al. Increased Circulating Levels of Interleukin-6 Induce Perturbation in Redox-Regulated Signaling Cascades in Muscle of Dystrophic Mice. **Oxidative Medicine and cellular Longevity**. Vol 2017, Article ID 1987218, pg 10, 2017.

PETKOVA, M. V; MORALES-GONZALES, S.; RELIZANI, K.; GILL, E.; SEIFERT, F.; RADKE, J.; STENZEL, W.; GARCIA, L.; AMTHOR, H.; SCHUELKE, M. Characterization of a Dmd (EGFP) reporter mouse as a tool to investigate dystrophin expression. **Skeletal muscle**, v. 6, p. 25, 2016..

REEDS, P.J. E FIOROTTO, M.L. Growth in perspective. **Proc. Nutr. Soc.** 49: 411-420, 1990.

RESENDE, F. et al. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life sciences**, v. 79, n. 13, p. 1268 – 73, 22 ago. 2006.

SALAM, E. A.; MEGUID, I. A.; KORRAA, S. S. Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. 28, n. 3, p. 94-100, 2009.

SERRANO, A. L.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 18, p. 3050-3058, 2010.

SICINSKI, P.; GENG, Y.; RYDER-COOK, A. S.; BARNARD, E. A.; DARLISON, M. G.; BARNARD, P. J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. **Science**, v. 244, n. 4912, p. 1578-1580, 1989.

SIENKIEWICZ, D. et al. Duchenne muscular dystrophy: current cell therapies. **Therapeutic advances in neurological disorders**, v. 8, n. 4, p. 166–77, jul. 2015

STROBER, J. B. Therapeutics in duchenne muscular dystrophy. **The American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 3, n. 2, p. 225-234, 2006.

SUNDARESAN , A.; RADHIGA,T.; VISWANA,K.; PUGALENDI,T.Ursolic acid and rosiglitazone combination improves insulin sensitivity by increasing the skeletal muscle insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. **Journal of Physiology and Biochemistry**. v. 72, p. 345–352, 2016.

TZENG, R. Y., AND W. A. BECKER. Growth patterns of bodyand abdominal fat weight in male broiler chickens. **Poult. Sci.** 60:1101–1106, 1981.

VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews. Molecular cell biology*, v. 11, n. 10, p. 700–14, out. 2010.

VAN PUTTEN, M.; KUMAR, D.; HULSKER, M.; HOOGAARS, W. M.; PLOMP, J. J.; VAN OPSTAL, A.; VAN ITERSSEN, M.; ADMIRAAL, P.; VAN OMMEN, G. J.; 'T HOEN, P. A.; AARTSMA-RUS, A. Comparison of skeletal muscle pathology and motor function of dystrophin and utrophin deficient mouse strains. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, n. 5, p. 406-417, 2012.

WILLMANN, R.; DE LUCA, A.; BENATAR, M.; GROUNDS, M.; DUBACH, J.; RAYMACKERS, J. M.; NAGARAJU, K. TREAT-NMD. Neuromuscular Network. Enhancing translation: guidelines for standard pre-clinical experiments in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 22, n. 1, p. 43-49, 2012.

ZHOU, L.; RAFAEL-FORTNEY, J. A.; HUANG, P.; ZHAO, X. S.; CHENG, G.; ZHOU, X.; KAMINSKI, H. J.; LIU, L.; RANSOHOFF, R. M. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. **Journal of Neurological Science**, v. 15, n. 1-2, p. 106-111, 2008.

ANEXO A – CEUA - Faculdade de Medicina do ABC

Comissão de Ética no uso de animais (CEUA)
Faculdade de Medicina do ABC
 Mantida pela Fundação do ABC

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**O efeito do suplemento do ácido ursólico em camundongos MDX**”, registrada com o nº **07/2016**, sob a responsabilidade da **Drª. Thais Borges Lessa e Aline Cadorini Silveira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado no dia 22 de setembro de 2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-FMABC) da Faculdade de Medicina do ABC.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/09/2016 a 15/12/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico – Linhagem Mdx
Nº de animais	30
Peso/Idade	15-25g
Sexo	Macho
Origem	Biotério da FMABC

Santo André, 22 de setembro de 2016.

 Profª. Drª. Giuliana Petri
 Coordenadora da CEUA da FMABC

ANEXO B – Termo de doação de animais para estudos

FACULDADE DE MEDICINA DO ABC

Mantida pela Fundação do ABC

TERMO DE DOAÇÃO DE ANIMAIS PARA ESTUDOS

A Faculdade de Medicina do ABC, situada à Av. Príncipe de Gales, 821 - Santo André/SP - CEP: 09060-650, representada pelo Dr. David Feder, professor titular da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Medicina do ABC, vem por meio deste termo, doar 30 (trinta) camundongos *mdx* (*Mus musculus* linhagem C57/BLmdx), machos, idade: 30 dias, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina do ABC. Tendo como finalidade exclusiva a utilização destes no projeto de pesquisa realizado pela mestranda Aline Cadorini Silveira, número USP 9715208, aluna da pós-graduação do programa da Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ/USP. Tendo como propósito analisar **"O EFEITO DO SUPLEMENTO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS MDX"**. Os materiais biológicos destes exemplares não serão usados em outros projetos.

Declaro que concordo com a doação desses animais.

Sem mais,

Atenciosamente

Santo André, 19 de setembro de 2016

Prof. Dr. David Feder

Titular de Farmacologia

SuperScript® IV Reverse Transcriptase

Package contents

Catalog Number	Size	Kit Contents
18090010	2,000 units	Kit Contents
18090050	10,000 units	
18090200	4 × 10,000 units

Storage conditions

Store at -20°C (non-frost-free)

Required materials

- Template: RNA
- Oligo(dT)₂₀ primer (Cat. no. 18418-020), random hexamers (Cat. no. N8080127), or 2 µM gene-specific primers
- 10 mM dNTP mix (Cat. no. 18427-013)
- RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Cat. no. 10777-019)
- *E. coli* Ribonuclease H (RNase H) (Cat. no. 18021-014)
- DEPC-treated water (Cat. no. 10813-012)

Timing

- Preparation time: 10 minutes
- Run time: 20 minutes

Go online to view related products.

PCR Enzymes and Master Mixes
RT Enzymes and Kits
Real-Time PCR Instruments
Real-Time PCR Master Mixes
PCR Thermal Cyclers

Selection guides

Product description

For first strand cDNA synthesis using total RNA or poly(A)⁺-selected RNA primed with oligo(dT), random primers, or a gene-specific primer.

Important guidelines

Pre-warm the 5× SSIV Buffer to room temperature before use. Vortex and briefly centrifuge the buffer prior to preparing the reverse transcription reaction mix.

Online resources

Visit our product page for additional information and protocols. For support, visit www.lifetechnologies.com/support.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

invitrogen
life technologies

Protocol outline

- Anneal primer to RNA
- Assemble reaction mix
- Add reaction mix to annealed RNA

RT reaction setup

Use the measurements below to prepare your RT reaction, or enter your own parameters in the column provided.

Component	20-µL rxn	Custom	Final Conc.
DEPC-treated water	to 20 µL	to µL	N/A
5× SSIV Buffer	4.0 µL	µL	1×
10 mM dNTP mix (10 mM each)	1.0 µL	µL	0.5 mM each
100 mM DTT	1.0 µL	µL	5 mM
RNaseOUT™ RNase Inhibitor (40 U/µL)	1.0 µL	µL	2.0 U/µL
50 µM Oligo d(T) ₂₀ primer, or 50 µM random hexamers, or 2 µM gene-specific primer	1.0 µL 1.0 µL 1.0 µL	µL	2.5 µM 2.5 µM 0.1 µM
Template RNA*	varies	µL	< 5 µg total RNA or < 500 ng mRNA

* 10 pg–5 µg total RNA or 10 pg–500 ng mRNA

RT protocol

- Go to page 2 for instructions on preparing and running your RT experiment.

Optimization strategies and troubleshooting

Refer to the pop-ups below for guidelines to optimize and troubleshoot your RT reaction.

- RNA Sample Prep

- RT Guidelines

- Troubleshooting

- Limited Warranty, Disclaimer, and Licensing Information

life
technologies

SuperScript® IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction

The example procedure below shows appropriate volumes for a single 20- μ L reverse transcription reaction. For multiple reactions, prepare a master mix of components common to all reactions to minimize pipetting error, then dispense appropriate volumes into each reaction tube prior to adding annealed template RNA and primers.

Steps

Procedure

1

Anneal primer to template RNA

Combine the following components in a reaction tube.

Note: Consider the volumes for all components listed in steps 1 and 2 to determine the correct amount of water required to reach your final reaction volume.

Component	Volume
50 μ M Oligo d(T) ₂₀ primer, 50 μ M random hexamers, or 2 μ M gene-specific reverse primer	1 μ L
10 mM dNTP mix (10 mM each)	1 μ L
Template RNA (10 pg–5 μ g total RNA or 10 pg–500 ng mRNA)	up to 11 μ L
DEPC-treated or nuclease-free water	to 13 μ L

2

Prepare RT reaction mix

Mix and briefly centrifuge the components.

Heat the RNA–primer mix at 65°C for 5 minutes, and then incubate on ice for at least 1 minute.

Vortex and briefly centrifuge the 5 $\times$ SSIV Buffer.

Combine the following components in a reaction tube.

Component	Volume
5 $\times$ SSIV Buffer	4 μ L
100 mM DTT	1 μ L
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 μ L
SuperScript® IV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L)	1 μ L

Cap the tube, mix, and then briefly centrifuge the contents.

3

Combine annealed RNA and RT reaction mix

Add RT reaction mix to the annealed RNA.

4

Incubate reactions

If using random hexamer, incubate the combined reaction mixture at 23°C for 10 minutes, and then proceed to step b.

If using oligo d(T)₂₀ or gene-specific primer, directly proceed to step b.

Incubate the combined reaction mixture at 50–55°C for 10 minutes.

Inactivate the reaction by incubating it at 80°C for 10 minutes.

5

Optional: Remove RNA

Amplification of some PCR targets (>1 kb) may require removal of RNA.

To remove RNA, add 1 μ L *E. coli* RNase H, and incubate 37°C for 20 minutes.

6

PCR amplification

Use your RT reaction immediately for PCR amplification or store it at –20°C.

Note: As a recommended starting point for PCR, reverse transcription reaction (cDNA) should compose 10% of the total reaction volume